

Empleo de la espectroscopia VIS NIR para la identificación de trazas de cacahuete en productos alimentarios en polvo

Teresa R. Cuadrado Domínguez¹, Satyabrata Ghosh¹, Pilar Barreiro,¹ Lourdes Lleó García¹, Belén Diezma¹, Jean Michel Roger², Teresa García Lacarra³

¹LPF-TAGRALIA. Grupo de Investigación. E.T.S.I. Agrónomos. Dpto. Ingeniería Rural. Universidad Politécnica de Madrid. CEI Moncloa. Ciudad Universitaria sn, 28040. Madrid. España.

pilar.barreiro@upm.es

²TRADETBIO. Grupo de Investigación. UCM. CEI Moncloa:

Resumen

En el mundo existen ciertos grupos de población que muestran una hipersensibilidad a determinados alimentos, y cuya ingestión accidental desencadena, una respuesta del tipo “shock” anafiláctico. Esto ha obligado a las empresas alimentarias a estudiar de forma exhaustiva la gestión del riesgo de todos sus productos. El cacahuete es uno de los principales alérgenos en la industria. La espectroscopia NIR se ha utilizado recientemente para analizar la cantidad total de aceite y ácido grasos en cacahuete intacto (Sudaram y colaboradores, 2012).

El objetivo de este trabajo es estudiar métodos no destructivos basados en espectroscopia para la detección de trazas de cacahuete en alimentos en polvo, como complemento al método genético reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real Time -PCR) desarrollado por el grupo de investigación TRADETBIO de la UCM, en el marco de colaboración en el Campus de Excelencia Internacional Moncloa.

Los materiales utilizados fueron cacahuets de cinco variedades de origen geográfico distinto y sometidas a diferentes tratamientos, proporcionadas por el Instituto de Materiales de Referencia CE, así como leche en polvo, cacao, harina de trigo, y cacahuete de diferentes marcas comerciales. Para todos ellos, se adquirieron dos series de espectros: en el infrarrojo cercano NIR (896-1686 nm), y los extraídos de imágenes hiperespectrales HIS (400-1000nm).

La espectroscopia VIS se mostró sensible a las diferencias en el cacahuete en cuanto a su origen y/o tratamiento, ya que inducen cambios en el color, siendo inviable la separación entre los cacahuets blanqueados, la leche y la harina en esta región espectral. Las principales diferencias entre los cacahuets y el resto de ingredientes alimentarios se han encontrado en el rango NIR, específicamente en las longitudes de onda de (1207-1210 nm), relacionadas con una región de absorción de los lípidos. El infrarrojo permite 100% de segregación de cualquier tipo de cacahuete respecto al resto de los ingredientes alimentarios.

La espectroscopia NIR combinada con las técnicas de imagen (hiperespectral o multiespectral) podría por tanto, ser aplicado para detectar trazas de cacahuets en alimentos en polvo, no influyendo su origen y/o tratamiento, ya que es capaz de separar cualquier cacahuete del resto de los ingredientes alimentarios. Este método podría ser una técnica de cribado previo al método PCR de elevado coste.

Palabras claves: Alérgenos, calidad de alimentos, imagen hiperespectral, método no destructivo.

VIS-NIR spectroscopy for the detection of peanuts traces in powder food.

Abstract

Certain populations show hypersensitivity to certain foods, and accidental ingestion triggers a response “shock” anaphylactic. This has forced food companies to conduct a comprehensive risk management of all their products. Peanuts are one of the most important allergens in the industry. NIR spectroscopy has recently been used to analyze the total amount of oil and fatty acids on intact peanut (Sudaram et al., 2012).

The objective of this work is to study non-destructive methods that could be used by the food industries for detecting peanuts in powdered foodstuffs to supplement analytical techniques developed by the research group of the UCM TRADETBIO. All of this in the context of cooperation in the CEI Moncloa.

The materials used were five peanut varieties under different treatments and geographical origin, provided by the Institute for Reference Materials EC, also milk powder, cocoa, wheat flour, and peanuts of different trademarks. For all of them were measured two series of spectra: near infrared NIR (896-1686 nm) and the ones provided with the hyperspectral camera HIS (400 -1000 nm).

The results show that the VIS spectroscopy is sensitive to differences in the peanut as to its origin and / or treatment, since they induce changes in the color, being impractical the separation between blanched peanuts, milk and flour in this band spectral. The main differences between peanuts and other food ingredients have been found in the NIR range, specifically in the wavelength (1207-1210 nm), which are associated with a region of absorption of lipids. Infrared allows 100% of segregation of any type of peanut compared to other food ingredients.

NIR spectroscopy combined with imaging techniques (hyperspectral or multispectral) could therefore be applied to detect traces of peanuts in powdered food, not influencing its origin and / or treatment at it is capable of removing any peanut from the rest of the food. This method could be a screening technique for the high cost method PCR.

Keywords: Allergen, food quality, hyperspectral imaging, nondestructive method.

Introducción

El cacahuete es el principal alérgeno en Estados Unidos; se estima que la alergia en la población puede situarse alrededor del 1%. La alergia al cacahuete se ha visto incrementada en los últimos años, debido al aumento de su consumo. El cacahuete es asimismo, muy utilizado en la industria alimentaria como aditivo, lo que supone un riesgo para los pacientes alérgicos ya que pequeñas dosis son capaces de inducir manifestaciones clínicas graves. Con el objetivo de evitar el riesgo potencial para la salud del consumidor con hipersensibilidad, se ha aprobado la Directiva 2003/89/ CE del Parlamento y del Consejo Europeo, de 10 de noviembre de 2003. Esta norma obliga a un etiquetado exhaustivo, haciendo obligatoria la mención a la presencia de sustancias que puedan provocar alergias e intolerancias (González, García et al. 2005).

En la actualidad existen dos técnicas genéticas analíticas que se han utilizado en otras investigaciones para la cuantificación del cacahuete son *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Elisa*, (Casas, 2004) y *Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real TR-PCR* (Calleja, Lunadei et al, 2012)

Durante los últimos años la espectroscopia de infrarrojo cercano se ha convertido en una herramienta indispensable en investigación y ha abierto nuevas tendencias en aplicaciones industriales, ya que presenta una excelente capacidad de obtener información precisa (Piqueras, Burger et al. 2012). Una de las aplicaciones de la espectroscopia NIR para el control de los procesos de elaboración de alimentos es la de estimación de la composición de sus principales constituyentes químicos (agua, carbohidratos, proteínas y grasa) e incluso de compuestos más minoritarios (Jimaré, Bosch et al. 2008).

Material y Métodos

Se consideraron dos grupos de materiales: a) Los de referencia proporcionados por el Instituto de Materiales de Referencia CE consistían en cinco variedades de cacahuets *Runner* (RPA), *Common Natal* (RPB), *Virginia* (RPC), *Virginia* (RPD), *Jumbo Runners* (RPE), y un 6° vial que contenía una mezcla de todas las muestras (RPF), todos ellos de diferentes orígenes geográficos y sometidos a distintos tratamientos (Tabla 1). b) Las muestras comerciales de cacahuete (MP), leche en polvo (MM), la harina de trigo (MF), y cacao en polvo (MCC) se obtuvieron de varios supermercados de Madrid. Los cacahuets se comercializaban en España pero procedían de China.

Las muestras comerciales fueron sometidas a proceso de cribado a través de un conjunto de tamices de 160/125/100/80/63/50/40 micras. Para este estudio se seleccionaron las partículas retenidas en los tamices primero y tercero, respectivamente, de modo que el tamaño de ambas muestras corresponde a 125-100 micras y 212 a 160 micras. Mientras que los cacahuets comerciales fueron triturados a través de un molino mecánico y se consideraron dos tamaños de partícula: uno por encima de 2000 μm y por debajo de 1000 μm .

inTabla 1: Especificaciones de las muestras de cacahuete de referencia, la nomenclatura, el origen, el tamaño y el tratamiento dispuesto por el Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (IRMM-481) Estas muestras constituyen un kit (IRMM-481) con seis frascos diferentes que contienen polvo de cacahuete sin sal con un tamaño de partícula comprendido entre 500 a 1000 m.

| Variedad | Origen | Tratamiento | Tamaño de partícula (µm) | Peso (g) |
|---------------------|------------|--|--------------------------|----------|
| Runner (RPA) | Argentina | Blanqueado, aire caliente a 140°C durante 20 min | 500 – 1000 | 2 |
| Common Natal (RPB) | Sur África | Tostado, aire caliente a 160°C durante 13 min | 500 – 1000 | 2 |
| Virginia (RPC) | USA | Blanqueado, aceite caliente a 145°C durante 25 min | 500 – 1000 | 2 |
| Virginia (RPD) | China | Blanqueado, aceite caliente a 140°C durante 9 min | 500 – 1000 | 2 |
| Jumbo Runners (RPE) | USA | Solamente blanqueado | 500 – 1000 | 2 |
| Mexcla (RPF) | - | Todos los tratamientos de la A a la E | 500 – 1000 | 5 |

El protocolo de preparación de las muestras, consistió primeramente en llenar los portamuestras (recipientes de plástico blanco de 30 mm de diámetro y 10 mm de profundidad de forma cilíndrica) con 1g de producto alimentario, y posteriormente aplicar o no una presión en toda la superficie de $1,4 \cdot 10^4 \text{ N/m}^2$ para lograr una superficie lisa y uniforme. Para todos los materiales se adquirieron dos series de espectros: infrarrojo cercano NIR (896-1686 nm, $n = 1110$) y los extraídos a partir de imágenes hiperespectrales HIS en el rango visible extendido (400-1000 nm, $n = 8788$).

Las mediciones espectrales de NIR se realizaron utilizando un espectrofotómetro de la marca Hamamatsu: PMA-1. La fuente emisora de luz fue una lámpara halógena de la marca Monolight Optical Spectrum Analyzer cuyo modelo es MIO-6262-100, con una de bombilla de sulfato de tungsteno modelo L5E96011 a 12/100 W de la marca Quantity. Para la transmisión de la luz se empleó una guía de fibra óptica bifurcada y aleatorizada cuyo modelo fue MIO-6134-SS/N6794. Cada medición se repitió tres veces para diferentes tiempos de integración comprendidos 50 ms a 200 ms.

Las imágenes hiperespectrales HIS se tomaron mediante un sistema de barrido; se utilizó una cámara Hyperspec VNIR (400 nm -1000 nm), cubierta de una caja negra para evitar interferencias de luz exterior. Se empleó una lámpara halógena. La rendija utilizada antes del detector fue de 25 µm.

Con estas condiciones el tamaño del píxel de las imágenes adquiridas fue de 69,7 micras x 69,7 micras y la resolución espectral fue de 3,2 nm (189 longitudes de onda).

Los espectros de todos los materiales alimenticios (Tabla 2 y la Tabla 3) se analizaron con Matlab R2011. El número total de espectros fue de $n = 8.788$ para HIS (400-1000 nm), y $n = 1110$ para NIR (896-1.600nm). Los dos conjuntos de datos se utilizaron de forma independiente por lo que se llevaron a cabo dos análisis de componentes principales (PCA) con el fin de establecer las características espectrales de los diferentes ingredientes alimentarios.

Los PCAs sobre los espectros HIS de los cacahuets de las muestras de referencia se llevaron a cabo para evaluar su segregación en cuanto al tratamiento de blanqueado y tostado. Por otra parte el objetivo del PCA sobre los espectros NIR fue determinar las longitudes de onda específicas para la identificación de cualquier tipo de cacahuete con respecto al resto de alimentos en polvo.

Tabla 2. *Números de espectros NIR: Cacahuets comerciales (MP), Leche (MM), Harina de trigo (MF), Cacao (MCC).*

| Técnicas | MP | MM | MF | MCC | TS* |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| NIR | 298 | 210 | 215 | 204 | 927 |

Tabla 3. *Números de NIR, visible e Hiperespectral de cacahuets de referencia (RPA-RPF) y cacahuets comerciales (MCC).*

| Técnicas | RPA | RPB | RPC | RPD | RPE | RPF | MCC | TS* |
|----------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| HIS | 758 | 860 | 685 | 1548 | 1308 | 1511 | 2118 | 8788 |
| NIR | 26 | 21 | 24 | 33 | 31 | 23 | 25 | 183 |

Resultados y Discusión

Análisis de espectros HIS

En la figura 2, izquierda se muestran los espectros proyectados *scores* en el plano PC2 PC3 de la harina y la leche. Los resultados no permiten diferenciar entre la leche (cyan) y la harina (negro), apareciendo parcialmente solapados con los cacahuets de referencia blanqueado (azul). Sin embargo los valores de proyección de las muestras de cacahuete sobre los componentes PC2 y PC3 (figura 2, derecha) permiten separar los tratamientos de todos los cacahuets. Las proyecciones están situadas siguiendo un patrón de distribución ortogonal, que indica la existencia de dos factores no relacionados, en este caso el tratamiento de tostado y el tratamiento de blanqueado. Así, la muestra B (IRMM-481B) es el único cacahuete crudo y se diferencia claramente del resto, como ocurre con la muestra E (IRMM-481 E), que se corresponde con cacahuete blanqueado sin tostar. La muestra comercial etiquetada como M esta superpuesta con la muestra IRMM M-481 D cuyo origen es China, aspecto que también se ha confirmado a partir de la información del producto en la muestra comercial (MP). Por lo tanto el rango de VSS (400 - 1000 nm) no proporciona suficiente información para separar la harina y la leche de todo tipo de muestras de cacahuets, por lo que se propuso también el rango espectral NIR (900-1600 nm).

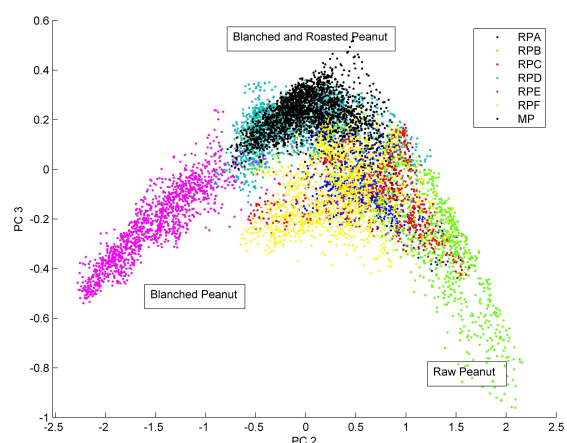
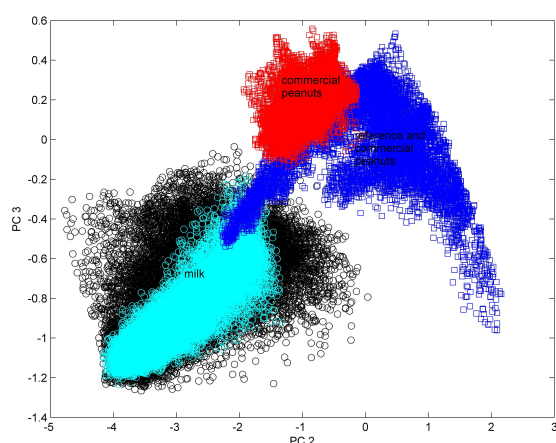


Figura 1. Izquierda, proyecciones de los espectros HIS de cacahuets de referencia (azul) y mercado (rojo) junto con espectros de harina (negro) y leche (cian) (Lacarra 2012). Derecha, proyecciones espectros de cacahuets de referencia (RPA,RPB,RPC,RPD,RPE,RPF) y de cacahuete comercial MCC.

Análisis de los espectros NIR.

Los coeficiente espectrales *loadings* del PC2 y del PC3 computados sobre NIR (fig. 3, primera línea, izquierda) muestran valores máximos en 1207 y 1210 nm. Esta región está relacionada con una banda de absorción de los lípidos (Tsai et al., 2001). La figura 3, primera línea, derecha muestra los espectros NIR promedio para cada ingrediente alimentario. El espectro promedio de cacao (línea de puntos) aparece diferenciada del resto de ingredientes en el rango comprendido entre 1150 y 1700 nm. Los espectros de todos los tipos de cacahuets (RPA-RPF) muestran una clara absorción alrededor de 1200 nm, que se relaciona con uno de los picos de absorción de los lípidos, mientras que los espectros medios de la leche, la harina y cacao (MM, MF, MCC) no presentan tal banda de absorción. La leche (MM) muestra una ligera absorción, ya que contiene un 26% de grasa. La figura 3, segunda línea corresponde a las proyecciones de todos los alimentos sobre el plano PC2 y PC3. Claramente separa los cacahuets (marcadores sin relleno) del resto de los alimentos leche, la harina y el cacao (marcadores rellenos). Los alimentos se distribuyen radialmente, y las posiciones externas (por encima de 0,8 del radio) corresponden a un tiempo de exposición alto. Se observa que cuanto mayor es el tiempo de exposición, mayores son las diferencias entre los *scores* de los alimentos, por lo tanto mejor es la segregación.

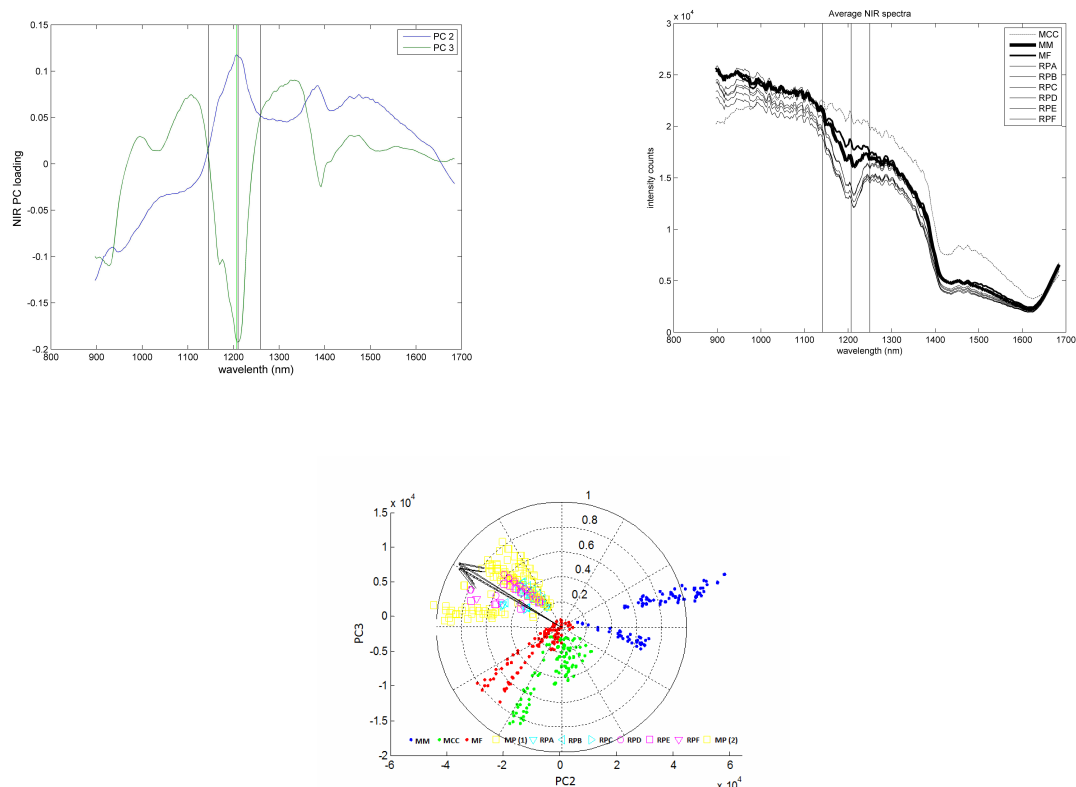


Figura 2. Primera línea, izquierda, *loadings* de los PC2 y PC3 computados sobre NIR; derecha, espectros medios NIR computados para los distintos alimentos leche (MM), harina de trigo (MF), cacao (MCC), cacahuets comerciales (MP) y cacahuets de referencia IRMM 481 (RPA, RPB, RPC, RPD, RPE, RPF); cada

media computada para $n = 1100$ espectros. Segunda línea, proyecciones de los espectros NIR de todos los alimentos sobre el plano PC2 y PC3.

Conclusiones

El espectro visible permite clasificar las muestras del cacahuete diferenciando entre tratamientos tostado y blanqueado. La proyección de los espectros de los productos alimenticios en polvo como la harina y la leche verifica que el cacahuete blanqueado no puede distinguirse de otros ingredientes alimenticios en el rango visible, por lo que se ha examinado el rango espectral NIR. Este rango permite identificar una banda en torno a 1200 nm (banda de absorción de lípidos) que segrega el cacahuete con respecto a la harina, la leche y el cacao en polvo. Se podrían proponer índices espectrales basados en la combinación de longitudes de onda alrededor de 1200, con el fin de poderlos emplear en un futuro sistema de visión multispectral. El empleo de índices espectrales como discriminación previa podría combinarse con el sistema de análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real RT-PCR para la identificación de trazas de cacahuets en alimentos, lo que abarataría enormemente el proceso de detección.

Agradecimientos

Proyecto PICATA del Campus de Excelencia Internacional de Moncloa (UCM-UPM, 2012).

References

- Casas Hernández, Agustín. "Diagnóstico Y Respuesta Al Tratamiento No-Quirúrgico En Periodontitis. Influencia De La Metodología Microbiológica." Universidad Complutense de Madrid, 2004.
- González, José Manuel Esther García, José Luis Fernández, Lara Gago, Javier Benito, José de la Sota Ríos (2007). Técnicas analíticas para la detección de gluten en alimentos. Madrid, Círculo de innovación en biotecnología, confederación empresarial de Madrid (CEOE), Comunidad de Madrid: 81
- Jimaré Benito, M.T., Catalina. Bosch, Fuensanta Sánchez Rojas. (2008). "Química analítica de procesos: Aplicaciones de la espectrometría de absorción en el infrarrojo cercano al análisis de biocombustibles y al análisis de alimentos". Química y Medio Ambiente, 104(4): 290-301.
- López Calleja L, Lunadei L, de la Cruz S, Barreiro P, García T. 2012. Hyperspectral images and polymerase chain reaction (PCR) for the detection of allergen (peanuts traces) in powder foods. EFFoST Annual Meeting. Montpellier.
- Piqueras, S., J. Burger, Romà Tauler, Anna de Juan. (2012). "Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution." Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 117(0): 169-182.
- Sundaram, Jaya, ChariV Kandala, RonaldA Holser, ChristopherL Butts, and WilliamR Windham. (2010) "Determination of in-Shell Peanut Oil and Fatty Acid Composition Using near-Infrared Reflectance Spectroscopy." Journal of the American Oil Chemists' Society 87, no. 10 1103-14.
- Tsai, C.L., Chen J. C., Wang, W.J. 2001. Near-infrared Absorption Property of Biological Soft Tissue Constituents. Journal of Medical and Biological Engineering, 21,7-14.